

機関番号：17102

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790843

研究課題名 (和文)

ALS での HIF-1 $\alpha$ /VEGF 系異常における転写因子核移行障害メカニズムの解明

研究課題名 (英文)

The analysis of the mechanism of the nuclear translocation disorder in ALS

研究代表者

立石 貴久 (TAKAHISA TATEISHI)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：50423546

研究成果の概要 (和文)：

私たちは、蛍光ビーズを用いたフローサイトメトリー法(fluorescent bead-based immunoassay)により、これまで不可能であった微量の髄液サイトカイン/ケモカインや各種成長因子の多項目同時測定に初めて成功し、ALS 患者では非炎症性神経疾患患者(other non-inflammatory neurological disease, OND)に比べ、MCP-1、G-CSF に加えて、IL-1 $\beta$ 、IL-8、IL-9、IL-17、tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、eotaxin、macrophage inflammatory protein-1 $\beta$ 、interferon- $\gamma$ -inducible protein-10 などの炎症性サイトカインおよび VEGF が有意に上昇していることを見出した。

また私たちは6世代16人の男女で常染色体優性遺伝形式の進行性筋萎縮と脱力を呈した、FUS 遺伝子変異を伴った家族性 ALS の日本人大家系を初めて報告し、その臨床・神経病理学特徴を明らかにした。発症から17年が経過した剖検例は、上位・下位運動ニューロンをはじめとして、多系統に渡り変性を認めた。残存神経細胞やグリアに多数の嗜銀性、好塩基性の細胞質内封入体を認め、FUS、GRP78/BiP、p62 およびユビキチン抗体で陽性だった。FUS 遺伝子の R521C 遺伝子変異により、核蛋白である FUS の核への移行障害が生じ、その異所性局在により細胞質内に封入体を形成すること、長期間の経過により中枢神経系に多系統変性と神経細胞内に好塩基性封入体を伴うことを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：

We measured the levels of 27 cytokines/chemokines and growth factors in cerebrospinal fluid (CSF) from 42 patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and 34 control patients with non-inflammatory neurological diseases (OND), using a multiplexed fluorescent bead-based immunoassay. Among cytokines/chemokines elevated in ALS, CCL2 and CXCL8 levels were negatively correlated with the revised ALS functional rating scale (ALSFRS-R) score, while CCL4 showed a positive correlation with ALSFRS-R score. CCL4 and CXCL10 showed negative correlations with disease progression rate. These chemokine alterations are assumed to somehow correlate with the clinical course of ALS.

We carried out clinical, neuropathological, and genetic studies on a large Japanese pedigree with familial ALS. In six successive generations of this family, 16 individuals of both sexes were affected by progressive muscle atrophy and weakness, indicating an autosomal dominant trait. The missense mutation c.1561 C>T (p.R521C) was found in exon 15 of FUS in the four patients examined. Neuropathological study of one autopsied case with the FUS mutation revealed multiple system degeneration in addition to upper and lower motor neuron involvement: the globus pallidus, thalamus, substantia nigra, cerebellum, inferior olivary nucleus, solitary nucleus, intermediolateral horn, Clarke's column, Onuf's nucleus, central tegmental tract, medial lemniscus, medial longitudinal fasciculus, superior cerebellar peduncle, posterior column, and spinocerebellar tract were all degenerated. Argyrophilic and basophilic neuronal or glial cytoplasmic inclusions immunoreactive for FUS, GRP78/BiP, p62, and ubiquitin were detected in affected lesions. The FUS R521C mutation in this Japanese family caused familial ALS with pathological features of multiple system degeneration and neuronal basophilic inclusions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000円	630,000円	2,730,000円
2010年度	1,200,000円	360,000円	1,560,000円
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000円	990,000円	4,290,000円

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：脳神経疾患、神経化学、神経病理学、筋萎縮性側索硬化症

### 1. 研究開始当初の背景

ALSは、全身の運動ニューロンが障害され呼吸不全により死に至る最重症の神経難病である。原因は不明で根治的な治療法もない。近年、ALSの進行にサイトカイン/ケモカインによる炎症機転の関与が指摘されている。私たちは、蛍光ビーズを用いたフローサイトメトリー法(fluorescent bead-based immunoassay)により、これまで不可能であった微量の髄液サイトカイン/ケモカインや各種成長因子の多項目同時測定に初めて成功し、ALS患者では非炎症性神経疾患患者(other non-inflammatory neurological disease, OND)に比べ、髄液中の macrophage chemoattractant protein-1 (MCP-1)や granulocyte colony stimulating factor (G-CSF)が有意に上昇していることを報告した。さらに申請者は、比較的進行の遅い脊髄性進行性筋萎縮症(spinal progressive muscular atrophy, SPMA)とALS患者を測定比較し、MCP-1、G-CSFに加えて、ALSではONDやSPMAより髄液中のIL-1 $\beta$ 、IL-8、IL-9、IL-17、tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、eotaxin、macrophage inflammatory protein-1 $\beta$ 、interferon- $\gamma$ -inducible protein-10などの炎症性サイトカインおよびVEGFが有意に上昇していることを見出した。髄液中MCP-1の上昇はALSの臨床的重症度の悪化(ALS FRSの低下)、髄液蛋白値と正の相関を示し、炎症機転(glial inflammation)の運動ニューロン障害への寄与が考えられた。髄液VEGF値はIL-1 $\beta$ やTNF- $\alpha$ と正の相関を示したことから、その上昇にはglial inflammationの関与が示唆された。これまでもALSではVEGFをはじめとする血管新生因子の関与が知られている。またVEGFのプロモーターであるhypoxia-response element (HRE)の欠失マウスでは下位運動ニューロンの変性を来すことも報告されている。転写因子HIF-1 $\alpha$ は低酸素下で安定化して核内に移行し、VEGFプロモーターのHREに結合することによって、VEGFの転写を促進する。HIF-1 $\alpha$ は低酸素下で安定化し、核内に移行してVEGFプロ

モーターのHREに結合することでVEGFの転写を促進する。

### 2. 研究の目的

ALS患者およびALSモデルマウスであるmSOD1トランスジェニックマウスの脊髄前角細胞におけるVEGF、HIF-1 $\alpha$ の発現状態を明らかにし、さらにHIF-1 $\alpha$ /VEGF系の異常において、転写因子であるHIF-1 $\alpha$ の核移行障害に核輸送因子であるkaryopherin  $\beta$ の関与を明らかにする。

FUS遺伝子変異を伴った家族性ALSの日本人大家系を初めて報告し、その臨床・神経病理学特徴を明らかにする。

### 3. 研究の方法

ALS患者およびモデルマウスであるmSOD1トランスジェニックマウスの脊髄組織に抗VEGF抗体、抗HIF-1 $\alpha$ 抗体、抗karyopherin  $\beta$ 抗体を用いて免疫染色を行い、densitometric analysisや核膜の染色パターンを解析した。

6世代に16人の発症者を伴う、常染色体優性遺伝形式の家族性ALS家系に対して、臨床調査、遺伝子解析、および神経病理学解析を行った。

### 4. 研究成果

私たちは孤発性ALS患者の脊髄前角細胞におけるVEGF、VEGF受容体、HIF-1 $\alpha$ の発現を免疫組織化学的に検討した。ALSでは非神経疾患患者に比し、脊髄前角細胞でVEGFおよびVEGF受容体の発現が低下する一方、HIF-1 $\alpha$ の発現は細胞質では亢進していたものの核内ではむしろ低下していた。また、mSOD1トランスジェニックマウスにおいても発症初期から同様の傾向が見られ、病期の進行に伴いその傾向が強くなっていった。したがって、孤発性ALSでは、運動ニューロンでのHIF-1 $\alpha$ の核内移行障害があり、それによりVEGFとその受容体の運動ニューロンにおける発現が低下することが初めて示された。

HIF-1 $\alpha$ の核内移行には核輸送因子である karyopherin  $\beta$  が関与している。そこで、ALS のモデルマウスである mSOD1 トランスジェニックマウスの脊髄前角細胞における、HIF-1 $\alpha$  の細胞質から核内への移行障害の機序を明らかにするため、karyopherin  $\beta$  の細胞質内と核内での局在について免疫組織化学的に検討した。野生型マウスでは前角細胞の核はびまん性に karyopherin  $\beta$  で染色されているのに対して、8週、12週 of mSOD トランスジェニックマウスでは karyopherin  $\beta$  の核膜周囲への沈着を認め、中でも20週目の mSOD トランスジェニックマウスでは細胞質にて高い染色性を認めた。また、karyopherin  $\beta$  の細胞質、核での染色を染色パターンで分類したところ、karyopherin  $\beta$  の染色性は細胞質で高い傾向が見られた。これらより核輸送因子である karyopherin  $\beta$  の核内移行障害に伴って、HIF-1 $\alpha$  の核内輸送も障害されていると推測された。

臨床経過を調査した6名の平均発症年齢は40.6歳であった。四肢の脱力は急速に進行し、発症から1年以内に呼吸不全に至った。3名では上肢近位筋優位の脱力を呈していた。ダイレクトシーケンス法にて FUS 遺伝子の塩基配列解析し、4名の発症者ではエクソン15にR521Cのアミノ酸置換を伴うC1561Tのミスセンス変異を認めた。発症者では病理学的には、上・下位運動ニューロンをはじめとして、前頭葉、後索、オリブ橋小脳路、黒質線条体路などに多系統の変性を認めた。HE染色にて動眼神経核、橋核、Meynert基底核の神経細胞内に嗜銀性好塩基性封入体を認め、これらは免疫染色にてFUS、GRP78/BIP、p62およびユビキチン抗体で陽性であった。また、免疫染色では広汎に神経細胞、グリア細胞にFUS抗体陽性の細胞質内封入体を認めた。以上より、FUS遺伝子変異を伴う家族性ALSではTDP-43と同様に異常FUS蛋白が多系統変性に寄与していることが示唆された。

FUSはHIF-1 $\alpha$ やTDP-43と同様に核内転写因子であり遺伝子の転写や選択的スプライシングの調節に関与している。以上の結果に基づいて考えると、ALSではTDP-43、HIF-1 $\alpha$ 、FUSなどの核内転写因子が細胞質から核内へ移行する過程が共通して障害されていると考えている。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計10件)

1. Tateishi T, Yamasaki R, Tanaka M, Matsushita T, Kikuchi H, Isobe N, Ohyagi Y, Kira J: CSF chemokine alterations related to the

clinical course of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuroimmunology*. 222:76-81.2010.

2. Tateishi T, Hokonohara T, Yamasaki R, Miura S, Kikuchi H, Iwaki A, Tashiro H, Furuya H, Nagara Y, Ohyagi Y, Nukina N, Iwaki T, Fukumaki Y, Kira J: Multiple system degeneration with basophilic inclusions in Japanese ALS patients with FUS mutation. *Acta Neuropathologica*. (Berl). 119: 355-364, 2010.

3. Yamasaki R, Tanaka M, Fukunaga M, Tateishi T, Kikuchi H, Motomura K, Matsushita T, Ohyagi Y, Kira J: Restoration of microglial function by granulocyte-colony stimulating factor in ALS model mice. *J Neuroimmunol*. 229:51-62, 2010.

[学会発表] (計2件)

1. Tateishi T, et al: Multiple system degeneration with basophilic inclusions in Japanese ALS patients with FUS mutation. 21st international symposium on ALS/MND. 2010年12月11日. Orlando, USA

2. 立石貴久, 他. FUS 遺伝子変異を認め好塩基性封入体を伴い多系統変性を呈した家族性ALSの病理学的検討. 第51回日本神経学会総会. 2010年5月20日. 東京

[図書] (計1件)

吉良潤一編. 九州大学出版会. 難病医療専門員による難病患者のための難病相談ガイドブック (改訂2版). 2011年. 208頁

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.kyushu-u.ac.jp/neuro/>

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

立石貴久(TAKAHISA TATEISHI)

研究者番号:50423546

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし